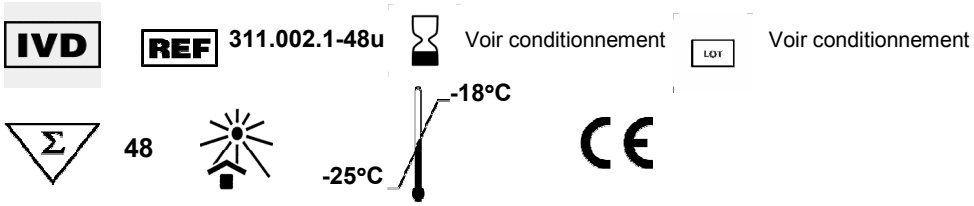
Mode d'emploi *ChromoQuant*® QF-PCR kit

ChromoQuant® Diagnostic QF-PCR in vitro ChromoQuant® kit d'analyse d'anomalies chromosomiques courantes des chromosomes 13, 18, 21 et X/Y



Mises en garde

S'utilise avec des séquenceurs fluorescents acceptant l'ensemble de filtre D pour les biosystèmes appliqués ABI PRISM®3100, 310, 3130 les analyseurs génétiques , et l'ensemble de filtre 2 pour Amersham Biosciences MegaBACE™ 500/1000. Veillez à ce que votre séquenceur accepte les marqueurs fluorescents 6-FAM, HEX et NED.

Il est recommandé d'utiliser avec ce kit de l'ADN purifié provenant du liquide amniotique, de prélèvements buccaux, de salive ou de sang. Le fonctionnement du kit ne peut être garanti que s'il est utilisé avec la Taq Polymérase recommandée. La Taq polymérase n'est PAS inclue dans ce kit. Pour obtenir des résultats de qualité, utilisez > 15 ng - < 150 ng d'ADN par échantillon PCR (InstaGene Matrix)

Pour des résultats PCR optimum, suivez les instructions communiquées pour l'instrument PCR disponible. Les bouchons de PCR cassés doivent être remplacés avant de passer à l'amplification PCR. Les échantillons de patients contaminés de sang ne doivent pas être analysés avec ce kit, par exemple lorsque l'ADN utilisé provient du liquide amniotique. Pour éviter tout risque de contamination croisée pendant la préparation de la PCR, veillez à ce qu'une nouvelle extrémité soit utilisée pour la pipette, pour chaque puits à remplir d'ADN.

Le sel interfère avec la séparation des fragments pendant l'électrophorèse du gel. Il est conseillé de procéder à un dessalage après la PCR. La qualité de la formamide ou de l'eau ajoutée à l'échantillon d'ADN avant le chargement ou l'injection électrocinétique affectera la sensibilité. Veillez à utiliser la meilleure qualité.

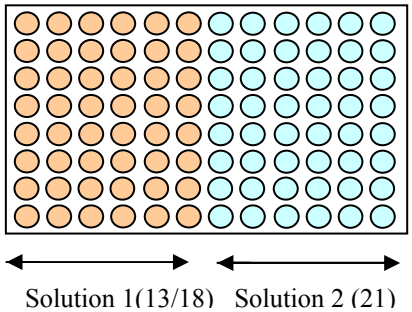
Les réactifs pour la purification de l'ADN génomique ne sont pas inclus dans le kit.

La technique PCR est protégée par les brevets déposés aux Etats Unis sous les numéros 4.683.195 et 4.683.202 et leurs homologues étrangers détenus par Hoffman-La Roche AB. L'utilisateur doit détenir une licence auprès de Hoffman-La Roche pour utiliser la technologie PCR.

Composition du kit

- Douze (12) bandes de 8 tubes.
- Chaque tube de PCR contient une solution primer-mix prête à l'emploi. Primer-mix Solution 1 – Chromosome 13, 18, X/Y. Primer-mix Solution 2 – Chromosome 21, X/Y.

  Une bande de 8 tubes ambrés suffit donc pour déterminer le chromosome 13/18 sur huit (8) patients et une bande de 8 tubes bleus suffit pour déterminer le chromosome 21 sur huit (8) patients.
- Bouchons de bandes PCR.
- 1 Tampon de dilution d'enzyme – 300µL dans un tube à bouchon vissé (blanc), (Tampon Tris, EDTA)
- 1 Tampon QF-PCR – 1,5 mL dans un tube à bouchon vissé (jaune)
  ($MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, dNTPs, β-mercaptoethanol, sérumalbumine bovine)



Instructions de stockage et durée de conservation après ouverture

- Conserver le tampon QF-PCR et les tubes PCR de primer-mix non utilisés dans le noir, à une température inférieure à -18°C. Le tampon de dilution d'enzyme peut être conservé entre –20 et +8°C.
- Utiliser du papier d'aluminium chaque fois que nécessaire pour protéger les tubes d'une exposition inutile à la lumière, par exemple lorsque vous travaillez avec le kit sur la paillasse du laboratoire, avant la PCR Il est recommandé de toujours conserver le matériel non utilisé dans son sachet d'aluminium refermable d'origine.
- Durée de conservation : Voir date limite d'utilisation.

Réactifs spécifiques supplémentaires devant être fournis par l'utilisateur

- *Taq polymerase HotStar Taq, Qiagen ; Ref 203203, 250U* [5U μL^{-1}] ou éventuellement *Taq polymerase*, GoTaq Promega Inc.; Ref. M8301 / M3171 [5U μL^{-1}]
- Fluorescent pour électrophorèse sur gel taille standard, par ex. ABI GeneScan®-500 [ROX]™ Ref. 401734 ou Amersham Biosciences ET-ROX Ref. 25-6550-01. Celui-ci sera ajouté à l'échantillon d'ADN après la PCR mais avant l'électrophorèse sur gel.
- Colonnes pour le dessalage du produit de PCR avant l'électrophorèse sur gel capillaire.
- Autres réactifs pour la purification de l'ADN génomique.

Comment utiliser ce kit

Purification et préparation de l'ADN

Les réactifs nécessaires pour purifier l'ADN provenant de tissus humains NE sont PAS inclus dans le kit. Il est recommandé d'utiliser des technologies de préparation d'ADN commerciales fournissant un ADN génomique pur.

Quelle que soit la méthode de préparation, diluer l'ADN pour obtenir une concentration finale de 1,5-15ng/µL en utilisant de l'eau stérilisée.

Amplification PCR Multiplex d'ADN génomique

1. Décongeler le tampon de QF-PCR et le tampon de dilution d'enzyme à température ambiante, et les placer sur de la glace.
2. Déterminer le nombre total de tubes PCR, c'est à dire de solution 1 + 2 (N).
3. Mélanger dans un microtube de polypropylène séparé (par ex. tube Eppendorf 1,5 ml)
   - 1,6 µTampon de dilution d'enzyme, 0,4 µL de Taq Polymérase et tampon QF-PCR de 13 µL multipliés par N. Préparer toujours quelques éléments supplémentaires.

     Les tubes PCR fournis avec le kit sont rangés par bandes de 8. Une bande de chaque couleur permettra d'analyser respectivement 8 échantillons de patients.

Pour obtenir de meilleurs résultats, il est recommandé de travailler rapidement sur de la glace.

4. Ajouter 15 µL du mélange principal de l'étape 3 dans chaque tube de PCR
5. Ajouter 10 µL d'échantillon d'ADN (15-150 ng). Mélanger en pompant 5 fois avec une pipette. Volume final 25µL.
6. Taper délicatement contre la paillasse les tubes placés sur la bande ou les passer dans une micro centrifugeuse pour s'assurer que tous les réactifs retombent au fond du tube PCR.
7. Procéder immédiatement à l'amplification PCR.

Protocole PCR :

Les étapes 2 à 4 sont répétées sur 26 cycles.
Choisir l'étape 1 de la PCR en fonction de la Taq polymerase utilisée (94°C 3 min pour la Taq Promega ou 95°C 15 min pour la Taq Qiagen).

Etape	No. de cycles	Temp.	Durée
1 HotStar Taq, Qiagen	1	95°C	15 min
1 GoTaq, Promega	1	94 °C	3 min
2	Répéter 26	94°C	30 s
3	"	57°C	1 min
4	"	71°C	2 min
5	1	71°C	5 min
6	1	60°C	1 h
7	Arrêt	4 °C	∞

Electrophorèse sur gel des fragments d'ADN amplifiés

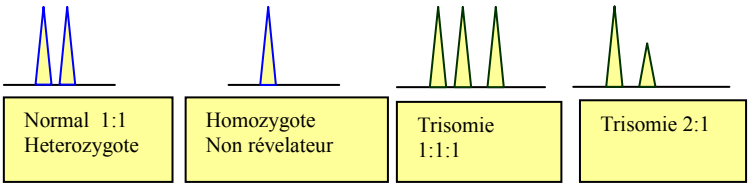
1. Dessaler individuellement chaque échantillon de PCR avant injection électrocinétique dans les capillaires.

2. Procéder à l'électrophorèse sur gel selon le manuel d'utilisation de l'instrument ou la meilleure routine du laboratoire pour obtenir la meilleure résolution de fragments entre 93 et 500 nucléotides.

Limites de la méthode et caractéristiques de performances

L'information concernant les marqueurs de chaque chromosome est 4-6 fois redondante (Chr. 13, 18 et 21). Un résultat analytique dans lequel deux des marqueurs d'un chromosome spécifique sont révélateurs doit être considéré comme réussi et peut être utilisé comme une indication de diagnostic.

Ce kit n'a pas été conçu pour évaluer ou déterminer si une translocation a été effectuée, impliquant les chromosomes 13, 18, 21, X ou Y. Cependant, il peut toujours être possible de détecter un état trisomique au niveau chromosomique. Ce kit ne doit pas être utilisé pour détecter des aberrations génétiques en mosaïques (par ex. lyonisation). En ce qui concerne le syndrome Turner X0, ChromoQuant® ne peut donner qu'une indication. D'autres méthodes sont recommandées pour diagnostiquer le syndrome Tuner X0.



Dans le cadre d'une STR, le ratio de pic est de 0,8 – 1,4. Le ratio de pic de la trisomie est <0,65 et >1,8. Zone ou hauteur de l'allèle le plus court divisée par la zone ou hauteur de l'allèle le plus long. Les ratios d'allèles se situant entre les marges de variations normale et anormale sont considérés comme non concluants et doivent faire l'objet d'une nouvelle analyse. Si, pour un même chromosome, on obtient des schémas d'allèle normaux et anormaux, il est impossible d'interpréter le résultat final comme étant normal ou anormal. Des études plus approfondies doivent être effectuées.

Pour une information détaillée sur l'interprétation des résultats, se reporter au Guide de l'Utilisateur de ChromoQuant. Le Guide de l'Utilisateur peut être téléchargé sur le site web de ChromoQuant ou commandé directement auprès de CyberGene AB. Ref. 901.115-00.

ChromoQuant 311.002.1-48u

Solution 1 – tube PCR amber

Marquer	Localisation	Chromosome	STR	Taille bp	Couleur	Dye label
AMEL	Xp22.31-Xp22.1 Yp11.2	X/Y (AMEL)	-	x: 103-108 y: 109-114	Vert	HEX
D18S391	18p11.31	18	Tetra	135-185	Vert	HEX
D18S976	18p11.31	18	Tetra	171-201	Bleu	6-FAM
XHPRT	Xq26.1	X	Tetra	260-304	Bleu	6-FAM
D13S742	13q12.13	13	Tetra	230-326	Vert	HEX
D18S386	18q22.1	18	Tetra	330-405	Vert	HEX
D13S634	13q21.33	13	Tetra	380-445	Bleu	6-FAM
D13S628	13q31.1	13	Tetra	420-475	Jaune	NED
D13S305	13q13.3	13	Tetra	425-470	Vert	HEX
D18S535	18q12.3	18	Tetra	450-505	Bleu	6-FAM

Solution 2 – tube PCR bleu

Marquer	Localisation	Chromosome	STR	Taille bp	Couleur	Dye label
DXS6854	Xq26.1	X	Tetra	93-119	Bleu	6-FAM
DXS6803	Xq21.31	X	Tetra	101-139	Vert	HEX
D21S1409	21q21.2	21	Tetra	193-219	Jaune	NED
SRY	Yp11.31	Y (SRY)	-	202-207	Bleu	6-FAM
X22	Xq28Yq	X/Y	Penta	190-250	Vert	HEX
D21S11	21q21.1	21	Tetra	220-285	Jaune	NED
D21S1246	21q22.2	21	Tetra	282-336	Vert	HEX
D21S1411	21q22.3	21	Tetra	292-340	Jaune	NED
D21S1444	21q22.13	21	Tetra	304-345	Bleu	6-FAM
D21S1435	21q21.1	21	Tetra	350-410	Vert	HEX

CyberGene AB, Box 30057, 104 25
Stockholm, Suède